

研究报告

利用定点突变分析白念珠菌依赖铁基因 *FRP1* 启动子元件

桂磊, 梁勇, 魏东盛, 郑雯, 邢来君, 李明春

南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要: 通过对白念珠菌高铁还原酶基因 *FRP1* 启动子进行突变分析, 确认启动子中特殊调控元件。我们通过分析 *FRP1* 起始密码子上游 1000 bp 序列发现在-160 和-650 处有 2 个推测的 Rim101p 结合位点, 对其分别进行定点突变, 然后构建启动子与报告基因 *LacZ* 融合质粒, 转化整合到白念珠菌 *rim101*^{-/-} 株和野生株中, 检测不同缺铁条件下 β-半乳糖苷酶活性。结果发现碱性条件, Rim101p 能够正向调控 *FRP1* 的表达; 启动子-160 处突变对启动子功能影响较弱, 而-650 突变使启动子活性大大降低, 此结果和双突变的结果相同, 表明 Rim101p 主要通过和启动子-650 处结合位点相互作用来调控 *FRP1* 的表达。

关键词: 定点突变, 白念珠菌, Rim101 蛋白, 高铁还原酶基因

Regulating Promoter Element of Iron-dependent Gene *FRP1* in *Candida albicans* by Site-directed Mutation

Lei Gui, Yong Liang, Dongsheng Wei, Wen Zheng, Laijun Xing, and Mingchun Li

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Microarray analysis revealed that the expression of ferric reductase (*FRP1*) can be regulated by the Rim101 protein. In order to find new transcriptional regulatory element in the promoter of *FRP1*, we analyzed the 1000 bp sequence upstream of ATG to find 2 potential Rim101p binding sites. We generated site-specific mutations in each of the two sites and fused these mutated promoters to *LacZ*. Then the promoter-*LacZ* fusion construct was recombinant into wild type and *rim101*^{-/-} strains for β-galactosidase assay. The results revealed that the *FRP1* was up-regulated in alkaline pH and this was caused by iron starvation. The -650 site, not the -160 site, had an important role in *FRP1* Rim101p-dependent expression. We conclude that Rim101p may interact with the -650 binding site of the promoter to regulate the *FRP1* expression.

Keywords: site-directed mutation, *Candida albicans*, Rim101 protein, ferric reductase gene

铁是生物必需的重要营养元素, 铁离子是许多生化途径, 例如呼吸作用, 三羧酸循环, DNA 和氨基酸的合成等过程中酶的辅助因子, 在自然界中, 生物体可直接吸收利用的铁非常有限, 因此微生物

在长期的进化过程中形成高亲和的铁吸收系统来满足细胞铁离子需要。真菌中, 高亲和吸收系统在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中研究最为详细^[1,2], 这个系统主要有 3 个关键酶组成, 位于细胞膜上的

Received: December 7, 2007; **Accepted:** February 27, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30570096), the Ph.D Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20070055011) and the Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China.

Corresponding author: Mingchun Li. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: lmchun68@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 30570096), 教育部博士点基金资助项目(No. 20070055011), 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留(2005)546 号)资助。

高铁还原酶(Frep)首先将外界三价铁还原为二价铁离子, 后二价铁经膜上多铜氧化酶-铁通透酶(Fet-Ftrp)复合物进入细胞内。在白念珠菌中至少存在 14 个高铁还原酶基因, Simon 等^[3]首先发现高铁还原酶基因 *FRE1(CFL1)*, 能够补救酿酒酵母 *Scfre1-/-* 株造成的生长缺陷。接着又发现了 *FRE10*^[4], 在 pH3.3 的缺铁环境中, *FRE10* 作为主要的高铁还原酶起作用, 目前还不清楚 pH 大于 6 时究竟哪个基因起作用, 而且至今还没有研究高铁还原酶启动子方面的报道。

RIM101 途径是真菌中保守的应答环境 pH 变化的信号传导途径^[5], Rim101 蛋白是这一途径的关键蛋白。通过基因组微阵列研究比对野生型和 *rim101-/-* 株基因表达情况发现, 在碱性环境下, 野

生株中许多基因发生上调, *rim101-/-* 株中这些基因并不改变, 这里面就包括许多铁应答基因如高铁还原酶 *FRP1*, 因此推测 *FRP1* 是白念珠菌在碱性环境下起作用的一个重要的高铁还原酶基因, 而且 *FRP1* 表达是受 Rim101p 调控的。对 *FRP1* 上游 1000 bp 序列分析发现在 -160 和 -650 处分别存在一个潜在的 Rim101p 结合位点(见图 1), 我们通过对这两个位点进行定点突变分析来确认 Rim101p 作为调控因子是如何调控 *FRP1* 基因表达的。

1 材料方法

1.1 实验菌株、质粒和引物

见表 1、表 2。

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains/plasmids	Genotypes	References
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>SupE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 recA1</i>	Conserved in this lab
DAY1	<i>ura3::λimm434/ura3::λimm434 arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG</i>	
DAY5	<i>ura3::λimm434/ura3::λimm434, arg4::hisG/arg4::hisG,his1::hisG/his1::hisG rim101::ARG4/rim101::URA3</i>	
DAY414	<i>Saccharomyces cerevisiae trp Δ</i>	Awarded by Dr. Dana Davis
pDDB211-D	Conserved in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>LacZ</i> gene	
pDDB78	Conserved in <i>E. coli</i> . Amp ^r , contains <i>hisG</i> from <i>Candida albicans</i>	

表 2 本实验使用引物

Table 2 The primers used in this work

Name	Primer sequence (5'-3')	Usage
P1	<i>catatg tgaagttaaact</i>	amplify <i>FRP1</i> promoter
P2	<i>aggtccaagaattaccgatc</i>	
E650mut	<i>gaacacaacgaagtagccggca</i> <i>atcggcgactagcaa</i>	
E650 anti-mut	<i>ttgctagtcgccgattccggccta</i> <i>cttcgtgtgttc</i>	primers for promoter mutation
E160 mut	<i>ttcgcagttttcgattccggcat</i> <i>agaaacgataaat</i>	
E160 anti-mut	<i>atttatcgtttctatccggcaatcc</i> <i>gaaaactgcgaa</i>	
LacZ 5' end	<i>gagggggagatgaagttaag</i>	detect <i>LacZ</i> gene
LacZ 3' end	<i>ggagcccattcagttgcttc</i>	

Note: digestion site is inclined; the putitive Rim101p binding site are underlined and the mutated bases are bold.

1.2 主要试剂

克隆载体 pGEM-T Easy Vector 及 Ligase 体系, 购自 Promega 公司; DNA 快速纯化/回收试剂盒、IPTG、X-gal、Taq plus DNA 聚合酶、dNTP、各种常用限制性内切酶、核酸分子量 Marker、T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素等主要购自北京鼎国生物技术

有限责任公司和宝生物生物工程公司, 限制性内切酶 *Drd I*、*Ase I* 等购自 NEB, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

LB 培养基和 YEPD 培养基^[7], 培养白念珠菌的 YEPD 培养基均添加终浓度为 80 μ g/mL 的尿苷。TC199 培养基(g/L): TC199 粉末一袋(9.5 g), 150 mL 1 mol/L HEPES, 1 mL 80 mg/mL 尿苷, 加去离子水至 1 L; 调溶液的 pH 至 4 或 8, 使用一次性过滤器过滤除菌。 β -半乳糖苷酶活性检测菌体都在 TC199 培养基中培养, 一般在菌体培养至对数期时通过添加 BPS(铁离子螯合剂)或者 $FeCl_3$ 来制造缺铁或者富铁环境。

1.4 $CaCl_2$ 法大肠的转化、酵母转化(醋酸锂)

见参考文献[7,8]。

1.5 重叠延伸 PCR 法对启动子定点突变

推测的白念珠菌 Rim101p 的 DNA 结合位点为 GCCAAGA, 根据 *FRP1* 启动子-160 处设计带有突变位点的引物 E160mut 和 E160 反 mut, 以 *FRP1* 启

动子为模板, 分别用 P1、E160 mut 和 P2、E160 反 mut, pfu 酶 PCR 获得带有突变的两端片段, DNA 回收试剂盒回收纯化后, 以这 2 条片段(比例 1:1)为模板, P1 和 P2 为引物 PCR 获得 1 条 1000 bp 的 DNA 条带, 即为突变完成的启动子 P_{FRP1-160mut}、P_{FRP1-650mut} 和 P_{FRP1-160-650mut} 突变方法同上。

1.6 β-半乳糖苷酶活性的测定

将转化子接种于 35 mL TC199 培养基中, 30°C 振荡培养至 OD₆₀₀ ≈ 1.0 时收集菌体, β-半乳糖苷酶活性的测定见文献[9], β-半乳糖苷酶的活性计算公式, OD₄₀₀(颜色)×1000/[OD₆₀₀(菌浓)×t(min)×3(稀释因子)] 单位为 Miller。

2 结果

2.1 FRP1 启动子突变

为了确定 FRP1 启动子中 2 个潜在的 Rim101p 结合位点作用, 我们分别对这 2 个位点进行定点突变, 并且进行两位点双突变。FRP1 启动子内不含 Nae I 的酶切位点, 突变后引入 GCCGCGC, 可以通过

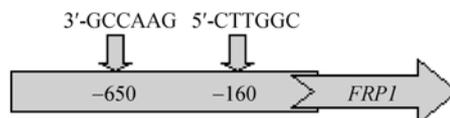


图 1 FRP1 启动子中含有 2 个 Rim101p 的潜在结合位点
Fig. 1 Diagram of the putative Rim101p binding sites within the FRP1 promoter

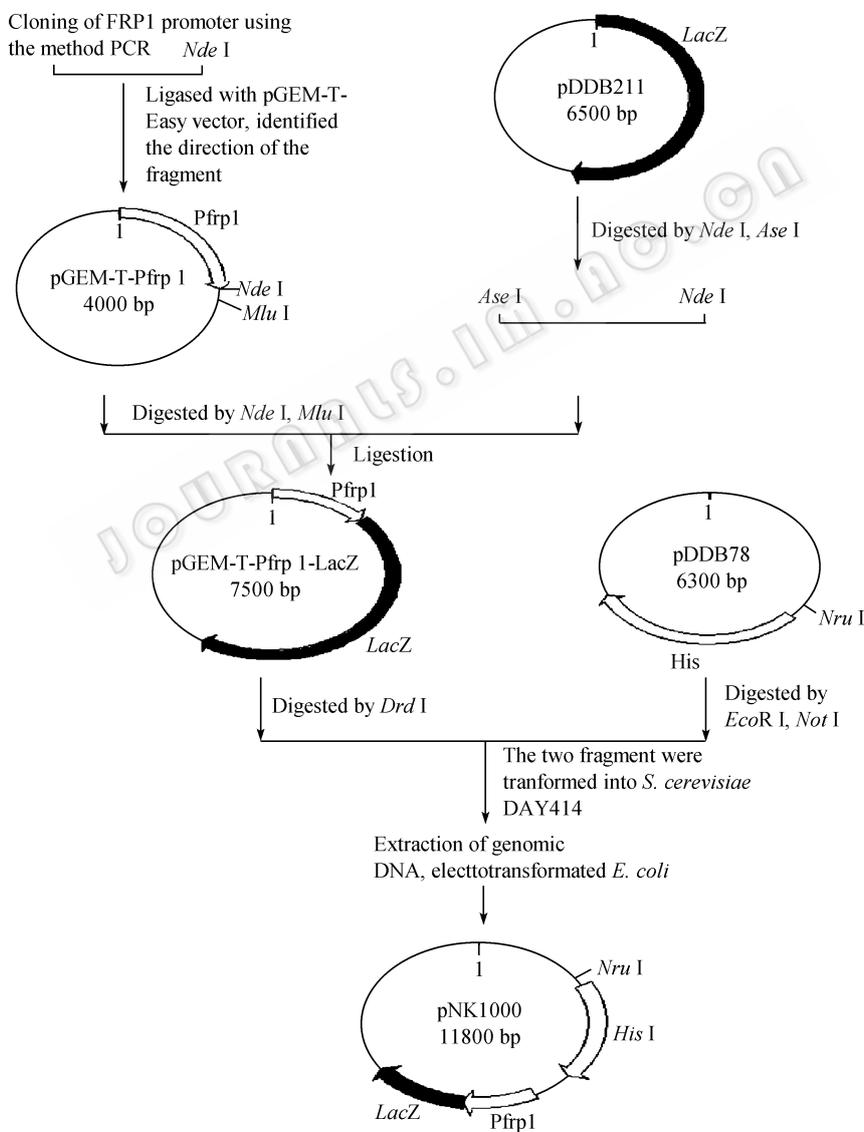


图 2 质粒构建图

Fig. 2 The process of plasmid construction

Nae I 酶切验证突变的成功率。将突变后的 PCR 产物用 *Nae* I 酶切(结果见图 3), 泳道 4 中 P_{FRP1} 不能被 *Nae* I 切开, 泳道 3 中 $P_{FRP1-650mut}$ 能被切出 650 bp 和 350 bp 大小的 2 条带, 泳道 2 中 $P_{FRP1-160mut}$ 能被切出 160 bp 和 840 bp 的 2 条带, 而 $P_{FRP1-160-650mut}$ 则被切出 160 bp、350 bp 和 390 bp 三条带, 这都与预期结果相符, 说明对 *FRP1* 启动子定点突变成功。突变启动子与 pGEM-Teasy 载体连接转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 挑取正确转化子通过测序进一步验证结果正确。

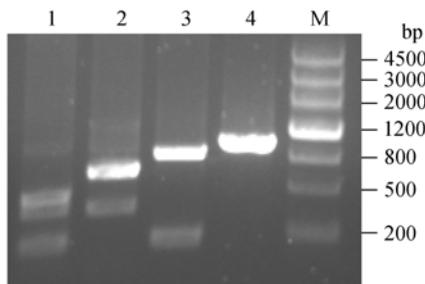


图 3 突变启动子 *Nae* I 酶切验证
Fig. 3 Identification of the mutated promoter by *Nae* I digestion

M: marker III; 1~4: $P_{FRP1-160-650mut}$, $P_{FRP1-650mut}$, $P_{FRP1-160mut}$, P_{FRP1} , respectively

2.2 *FRP1* 启动子与 *LacZ* 融合质粒的构建

FRP1 启动子与 pGEM-Teasy 载体连接转化 *E. coli*, 得到 pGEM-T- P_{FRP1} 质粒。含有嗜热链霉菌 (*Streptomyces thermophilus*) *LacZ* 报告基因的质粒 pDDB211 经 *Nde* I 和 *Ase* I 双酶切, 与经 *Nde* I 和 *Mlu* I (*Ase* I 的同尾酶) 双酶切的 pGEM-T- P_{FRP1} 质粒进行连接, 产生 pGEM- $P_{FRP1-LacZ}$ 质粒。经 *Drd* I 酶切后与 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pDDB78 用醋酸

锂转化的方法共转化到酿酒酵母 DAY414 中, 在 SC-try 缺陷培养基上筛选转化子。2 个质粒的片段在酵母中重组后回收质粒, 得到的终质粒 pNK1000, 质粒构建流程如图 2。pNK160mut pNK650mut 和 pNK160-650mut 质粒构建过程与 pNK1000 相同。质粒酶切鉴定结果和 PCR 鉴定结果如图 4, 与预计片段符合。

2.3 *FRP1* 启动子活性分析

质粒 pNK1000 含有与白念珠菌 *his* I 基因的同源区, 该质粒经 *Nru* I 酶切后的片断能够和基因组发生重组, 使得 *LacZ* 报告基因插入基因组中表达。分别转化白念珠菌野生型和 *rim101*-/- 突变株, 转化子在不同 pH (pH4 和 pH8)、不同铁离子浓度下培养, 我们通过比较 β -半乳糖苷酶活性的强弱来分析 *FRP1* 表达的变化与环境 pH 和铁限制环境之间相互关系 (见表 3)。分别以没有转化入质粒的野生株和 *rim101*-/- 缺陷株为对照 1 和对照 2, 白念珠菌中不含有 *LacZ* 基因, 因而我们可以通过 PCR 检测 *LacZ* 来确认质粒是否整合入基因组中。

由表 3 数据可知: (1) 对照 1 和对照 2 无论是在酸性、碱性环境还是碱性缺铁环境, 其 β -半乳糖苷酶活性都为 0, 说明对照 1 和对照 2 的 β -半乳糖苷酶活性是不受酸碱 pH 和缺铁环境影响的, 我们所测得的 β -半乳糖苷酶活性是完全由转入的启动子启动 *LacZ* 基因表达的结果; (2) 含有 $P_{FRP1-LacZ}$ 片段的野生型白念珠菌在 pH8 时的 β -半乳糖苷酶活性大于在 pH4 时的活性, 差异在 10 倍左右; 在 pH4 条件下添加 BPS 或 $FeCl_3$ 时对菌株的 β -半乳糖苷酶活性影响不大; 在 pH8 条件下在添加螯合剂时 β -半乳糖苷酶

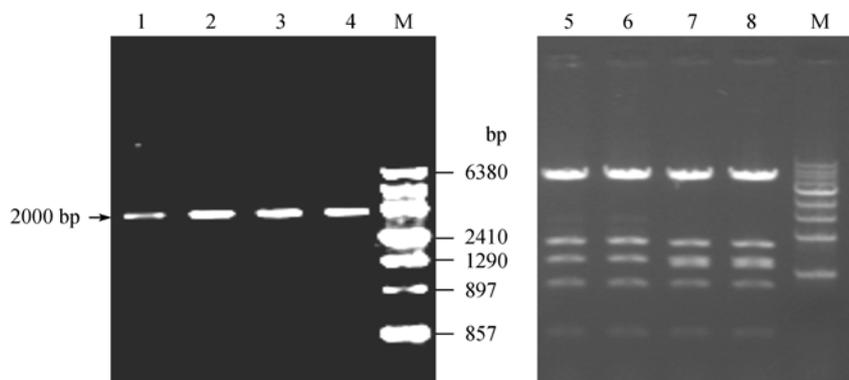


图 4 终质粒 PCR 检测和酶切鉴定

Fig. 4 Identification of final plasmids by PCR and enzyme digestion

M: marker VI; 1~4: PCR results of pNK1000, pNK650mut, pNK160mut and pNK160-650mut.; 5~8: pNK1000, pNK650mut, pNK160mut and pNK160-650mut were digested by *Bgl* II

活性能提高 19%，而加入 100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 后 β -半乳糖苷酶活性降低至 80%；而含有 P_{FRP1} - $LacZ$ 片断的 $rim101$ -/- 突变株中，在上述条件下的 β -半乳糖苷酶活性都在 10 左右，所以可以得出： $Rim101p$ 能够正向调控 $FRP1$ 的表达；碱性条件能够造成 $FRP1$ 的表达上调；碱性条件造成的 $FRP1$ 表达的上调是由于铁饥饿造成的。

表 3 含有 P_{FRP1} - $LacZ$ 片断的白念珠菌在不同条件下的 β -半乳糖苷酶活性

Table 3 β -Galactosidase assays were performed on P_{FRP1} - $LacZ$ reporter strains

	WT	$rim101$ -/-	Control 1 (WT)	Control 2 ($rim101$ -/-)
pH4	5.6 \pm 0.25	5.0 \pm 0.30	0	0
pH8	60 \pm 1.17	9.0 \pm 0.36	0	0
pH4+BPS ¹	10.5 \pm 0.46	6.4 \pm 0.28	0	0
pH8+BPS	71.2 \pm 1.6	12.5 \pm 0.86	0	0
pH4+ FeCl_3 ²	5.2 \pm 0.35	5.3 \pm 0.59	0	0
pH8+ FeCl_3	9.8 \pm 0.41	8.6 \pm 0.38	0	0

Note: At least three independent transformants were used to determine average Miller units and standard deviations.

¹ final concentration of BPS was 200 $\mu\text{mol/L}$; ² final concentration of FeCl_3 was 100 $\mu\text{mol/L}$

2.4 突变启动子活性分析

将突变终质粒分别转化白念珠菌野生株和 $rim101$ -/- 中，在不同的环境下培养，检测 β -半乳糖苷酶活性(结果见表 4)。在 pH4 下， $FRP1$ 各突变启动子在野生型和 $rim101$ -/- 株中活性低并且相差不大。在 pH8 下， $FRP1$ 各突变启动子转化 $rim101$ -/- 中活性与 pH4 下基本相同，都在 10 Miller 左右。而转化野生型菌株结果显示：1) $P_{FRP1-160\text{mut}}$ 启动子活性与 P_{FRP1} 活性基本相同，说明启动子-160 处突变不影响启动子功能，2) $P_{FRP1-650\text{mut}}$ 和 $P_{FRP1-160-650\text{mut}}$ 活性大大降低，与 P_{FRP1} 相比，活性降低近 10 倍，说明-650 位点突变严重影响启动子活性；在 pH8 下添加 BPS 所得结

果进一步表明在碱性缺铁环境下， $Rim101p$ 能够调控 $FRP1$ 的表达，并且其调控主要是通过与启动子-650 处结合位点相互作用来实现的。

3 讨论

在酿酒酵母中， $ScRim101p$ 并非直接调控高亲和吸收系统基因的表达，而是通过抑制 $SMP1$ 和 $NRG1$ 的表达，间接地促进高亲和吸收系统基因的表达^[10]。Ana M. Ramo'n 等^[11]研究揭示出白念珠菌 $Rim101p$ 是转录激活因子，能够直接结合一些碱性上调基因上游的启动子区，促进碱性上调基因的表达如 pH 应答基因 $PHR1$ ，Yong-Un B 等^[9]也发现 $Rim101p$ 在碱性环境下抑制 pH 应答基因 $PHR2$ 表达，并且分析出启动子结合 $Rim101p$ 的经典特异性序列为 CCAAGAA。所以在白念珠菌中， $Rim101p$ 即可以做为转录激活因子促进基因表达，同时还可以作为抑制因子抑制一些基因表达。本研究发现 $Rim101p$ 能正向促进 $FRP1$ 表达。 $Rim101p$ 在酸性环境下不起作用，因而我们只研究碱性环境下突变启动子在野生株和缺陷株活性的不同。通过对启动子中推测 $Rim101p$ 结合位点进行定点突变，构建突变启动子与 $LacZ$ 的融合结构，转化野生型和缺陷型菌株后，分析转化子 β -半乳糖苷酶的活性的检测结果发现，在中碱性环境下，-650 处突变会严重影响 $FRP1$ 启动子活性，而-160 位点突变则影响不大，说明 $Rim101p$ 可能主要通过与启动子-650 位点相互作用来调控 $FRP1$ 的表达。

为什么 $Rim101p$ 主要通过与启动子-650 位点相互作用，而不是-160？首先一个可能是结合位点到 ATG 距离影响结合作用，但是这一点明显不充分，在分析 $PHR2$ 启动子时发现 3 个 $Rim101p$ 结合位点，分别位于-51，-124，-575，-124 是起主要作用的位

表 4 含有突变的 P_{FRP1} - $LacZ$ 片断的白念珠菌在不同条件下的 β -半乳糖苷酶活性

Table 4 β -Galactosidase assays were performed on mutated promoter reporter strains

	pNK160mut		pNK650mut		pNK160-650mut	
	WT	$rim101$ -/-	WT	$rim101$ -/-	WT	$rim101$ -/-
pH4	10.5 \pm 0.43	2.3 \pm 0.30	6.4 \pm 0.51	3.2 \pm 0.33	7.7 \pm 0.41	4.8 \pm 0.27
pH8	68.2 \pm 1.02	3.7 \pm 0.45	5.5 \pm 0.28	4.1 \pm 0.52	7.4 \pm 0.53	2.2 \pm 0.19
pH8+BPS ¹	59.5 \pm 0.89	5.1 \pm 0.39	3.2 \pm 0.50	7.2 \pm 0.32	6.9 \pm 0.39	10.5 \pm 0.56

Note: At least three independent transformants were used to determine average Miller units and standard deviations

¹ final concentration of BPS was 200 $\mu\text{mol/L}$

点。从图 1 中可以看出 *FRP1* -160 和 -650 处序列呈反向互补, 推测认为结合位点的方向影响 Rim101p 与启动子间的互相作用。我们将利用 EMSA 实验进一步验证 Rim101p 与 *FRP1* 启动子相互作用。

生物体通过调控铁的获得来维持体内铁的动态平衡。即使在较低浓度的氧存在下, 游离铁也是非常有毒的, 细胞内游离的二价铁供出电子, 传递给氧形成三价铁和氧自由基。因此, 细胞根据外界铁的可吸收性和细胞内铁需要程度严格调控铁吸收系统。从 β -半乳糖苷酶的活性检测结果可以发现在 pH8 下添加 FeCl_3 , *FRP1* 启动子活性降低到 9 Miller 左右; 无论在 pH4 还是 pH8 下, 添加 BPS 进一步缺铁都会使启动子活性增强, 突变启动子也不例外, 所以我们推测还存在其他的转录因子调控 *FRP1* 的表达, 很有可能这些转录因子共同作用在转录水平调节着 *FRP1* 基因的表达。目前在 *Candida albicans* 中, 发现其他特殊的铁代谢调控因子, 如 *TUP1* 和 *SFU1*。*Tup1p*^[12] 是白念珠菌形态发生和代谢的一个普遍调控因子, 通过负调控铁吸收系统中关键组分的基因表达来实现对铁吸收的调控。除了 *S. cerevisiae* 外的其他丝状真菌是由一组 GATA-型转录因子调节含铁体合成和吸收基因的表达, 包括裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中 *Fep1p*、构巢曲霉中 *Sreap*、玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)中 *Urbs1p*、白念珠菌中称为 *Sfu1p*^[13], 基因组微阵列显示其能调控铁吸收基因, 另外有研究显示 *Sfu1p* 很可能通过与 *Tup1p* 相互作用调控铁吸收基因的表达。我们在 *FRP1* 启动子序列中也找到了这两个调控因子的识别位点, 这些位点的具体作用需要通过进一步的突变和缺失分析加以验证。另外我们将对启动子进行缺失分析, 以期找到其他的新的启动子特殊调控元件。

致谢: 本文所用的部分菌株是由美国明尼苏达大学 Dr. Dana Davis 慷慨赠送, 特此感谢。

REFERENCES

- [1] Daniel JK. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(5): 1185–1197.
- [2] Jeane DF, Henri W, Helen P, et al. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMetals*, 2003, **16**: 185–197.
- [3] Jane EH, Peter HW, Annette MC. *Candida albicans* *CFL1* encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* *fre1*-/- mutant. *Microbiology*, 2002, **146**: 869–876.
- [4] Simon ABK, Gaston V, Emmanuel L, et al. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun*, 2005, **73**: 5482–5492.
- [5] Eric SB, Samuel JM, Li MC, et al. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*, 2004, **54**: 1335–1351.
- [6] Li MC, Liang Y, Wei DS, et al. The response to environmental pH of RIM101 pathway in *Candida albicans*. *Acta Microbiol Sini*, 2007, **47**(2): 366–369. 李明春, 梁勇, 魏东盛, 等. 白念珠菌 *RIM101* 途径与环境 pH 的应答反应. *微生物学报*, 2007, **47**(2): 366–369.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Alison A, Daniel EG, Chris AK, et al. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [9] Yong-Un B, Samuel JM, Dana AD. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall β -Glycosidase *Phr2*. *Eukaryotic Cell*, 2006, **5**: 1550–1559.
- [10] Teresa ML, Aaron PM. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(2): 677–686.
- [11] Ana MR, William AF. Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryotic Cell*, 2003, **2**(4): 718–728.
- [12] Simon ABK, Emmanuel L, Robert S, et al. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the *TUP1* regulator. *Microbiology*, 2002, **148**: 29–40.
- [13] Lan CY, Gabriel R, Luis A, et al. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mor Microbiol*, 2004, **53**: 1451–1469.